



AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI*

Juliana Glória Franco¹, Paula Thaís Requena Nocchi², Angélica Albuquerque Tomilheiro Frias², Hudson Sérgio de Souza², Mariana Gomes Brescansin², William Mário de Carvalho Nunes³

RESUMO: A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, se apresenta como um patógeno de grande importância para todas as regiões cítricas do mundo, devido aos danos que causa e devido sua ampla gama de hospedeiro dentro do gênero *Citrus* e variabilidade genética. O objetivo deste estudo foi verificar a presença de diversidade genética de *X. citri* subsp. *citri* dentro de um pomar experimental, em que todas as plantas foram inoculadas com a mesma estirpe bacteriana no ano de 2004. Folhas com sintomas de cancro de 11 variedades de plantas mais suscetíveis, 9 menos suscetíveis e de 2 plantas mutantes foram coletadas e a bactéria foi isolada em meio de cultivo. Posteriormente o DNA de cada isolado foi extraído e sua amplificação foi realizada através da técnica de PCR, utilizando-se 14 marcadores microssatélites, sendo o resultado observado em gel de agarose a 2%. Com os dados obtidos foi gerada uma matriz binária de semelhança e um dendograma foi construído pelo método UNJ (Unweighted neighbor joining). A árvore foi gerada por análise Bootstrap de 1000 repetições. Os primers microssatélites amplificaram regiões do genoma de todos os isolados, mostrando a formação de três grupos distintos, revelando que existe variabilidade genética, mesmo que baixa, apesar de todos os isolados apresentarem a mesma origem (estirpe Xcc 306).

Palavras-chaves: Variabilidade, Cancro cítrico, Marcadores microssatélites.

1 INTRODUÇÃO

O Cancro Cítrico, considerado uma das doenças mais agressiva dos citros com distribuição mundial (GOTTWALD et al., 2002), é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006). Os principais sintomas do cancro são observados nas folhas e frutos, porém, toda parte aérea da planta cítrica pode ser afetada com lesões corticosas, salientes, de cor parda, em ambos os lados das folhas (KOLLER et al., 1993).

¹Mestrandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. juh_gfranco@hotmail.com

²Doutorandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES, CNPq. thaisnocchi@hotmail.com

³Orientador, Professor Doutor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM. Bolsista de Produtividade CNPq. william.nunes@pq.cnpq.br

Os principais sintomas do cancro são observados nas folhas e frutos, porém, toda parte aérea da planta cítrica pode ser afetada com lesões corticosas, salientes, de cor parda, em ambos os lados das folhas (KOLLER et al., 1993).

Esse estudo teve por objetivo avaliar a diversidade genética de isolados de *X. citri* subsp. *citri*, todos provenientes de um mesmo Pomar Experimental localizado em Maringá-PR, através da técnica de PCR de análise de multilocus desenvolvida por Bui Thi Ngoc et al. (2009), utilizando 14 marcadores microssatélites.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Isolados provenientes de 23 diferentes genótipos de *Citrus* spp. do Pomar Experimental, localizado no município de Maringá-PR, foram utilizados no estudo, além da estirpe Xcc 306, proveniente do acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), totalizando 24 amostras de *X. citri* subsp. *citri*.

As lesões foliares foram recortadas e desinfetadas, sendo mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito 1% por 3 minutos e enxaguadas 3 vezes em água para a remoção de impurezas e outros microorganismos indesejáveis como fungos e bactérias saprófitas. Utilizando-se uma lesão por amostra, cada lesão foi triturada em almofariz de gesso contendo 1000µL de solução salina. Uma alíquota de 50µL foi então transferida para microtubo contendo 450µL de solução salina. Este procedimento foi repetido por quatro vezes, com a finalidade de obter uma suspensão bacteriana mais limpa e menos concentrada, para ser possível a visualização de colônias individualizadas em meio de cultura.

Para a certificação de que todos os isolados pertenciam à espécie *X. citri* subsp. *citri*, foi realizado a extração de DNA de todos os isolados, sendo posteriormente realizada amplificação através da técnica de PCR utilizando um par de primer de *X. citri* subsp. *citri* (Xac 1 e Xac 2) e então as bandas geradas foram



observadas e fotografadas em gel de agarosea 1% corado com brometo de etídeo, sendo a visualização possível devido a incidência de luz UV sobre o gel.

A cultura bacteriana foi transferida do meio NA para microtubo de 1,5 mL, onde foi realizada a lavagem da cultura com 1000 µL de NaCl 5M, agitando-se o microtubo para a dissolução da suspensão bacteriana. Foi então realizada uma centrifugação a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante originado contendo impurezas, como resíduos de meio de cultura, foi descartado. Uma alíquota de 750 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 0,5M; EDTA 50 mM; SDS a 10%) foi adicionada à cultura bacteriana, que foi levada para banho maria à 65°C por 30 minutos. O DNA foi então amplificado por PCR com marcadores microssatélites, de acordo com protocolo de Bui Thi Ngoc et al. (2009). Os marcadores microssatélites utilizados foram 14 pares de primers (TABELA 2) (BUI THI NGOC, et al., 2009), montadas a partir da sequência completa do DNA da estirpe 306 de *X. citri* subsp. *citri* (DA SILVA et al., 2002). Para a realização da reação de PCR, foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), 14,85 µL de água milli-Q, 1,25 µL de MgCl₂(2,5mM), 1,00 µL de DNTP (10mM), 1,00 de cada primer, 3 µL da amostra de DNA e 0,4 µL de Taq DNA-polimerase (Invitrogen®).

As ampliações ocorreram em aparelho termociclador durante uma sequência de ciclos com diferentes temperaturas, sendo que cada ciclo de uma dada temperatura corresponde a um determinado processo que ocorre com o DNA. Durante os primeiros 15 minutos a 95°C, ocorreu a desnaturação inicial das fitas do DNA. As temperaturas de anelamento dos primers variaram de 64 a 70°C conforme cada primer(Tabela 1) durante 90 segundos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando a formação de bandas em gel de agarose a 2% geradas através da técnica de PCR, nota-se a existências de bandas com diferentes alturas. Isso ocorre para todos os 14 microssatélites utilizados. Avaliando a diversidade genética dos isolados de *X. citri* subsp. *citri*, pode-se observar a formação de três grupos distintos, mostrando que apesar de baixa, existem diferenças entre os isolados (Figura 1 e 2). Esta baixa diversidade evidencia a proximidade genética dos isolados e que a origem destes não influenciou em suas variabilidades genéticas. Tal resultado pode ser considerado como reflexo do fato de que todas as plantas cítricas do pomar foram inicialmente inoculadas com o mesmo isolado (Xac 306) (CARVALHO et al.,2014). Portanto, considera-se que as populações de *X. citri* subsp. *citri* do pomar experimental localizado no município de Maringá-PR, são clonais e possuem forte ligação genética.

Resultados semelhantes foram observados por Gonçalves-Zuliani (2014), ao estudar a diversidade genética de isolados de diferentes regiões do estado do Paraná, onde também verificou baixa diversidade genética entre os isolados, obtendo uma árvore genealógica (dendograma) com formação de três diferentes grupos. Este autor atribui a baixa diversidade ao fato dos isolados serem clonais e por não ocorrer muita mutação genética devido à não existência de pressão de seleção por causa da pequena variação de citros comerciais, visto que as cultivares comerciais de citros utilizadas são em maioria compostas por apenas três espécies (*C. sinensis*, *C. paradisi* e *C. limon*).

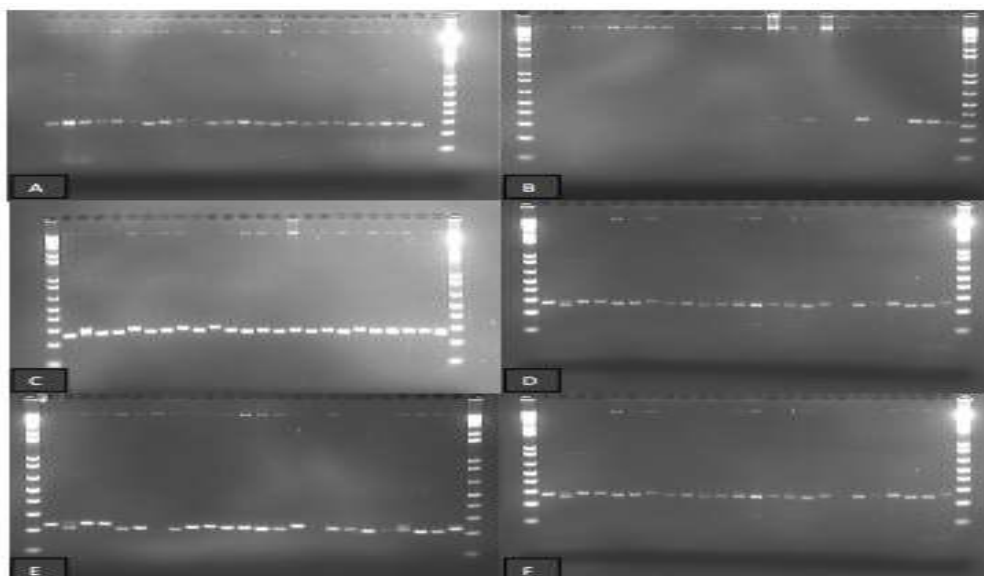


Figura 01. Produto da amplificação por PCR do DNA de isolados de *Xanthomonas citri* subsp.



citri utilizando 14 pares de primers microssatélites revelados em gel de agarose a 2%. A - par de primer microssatélite XL1; B-par de primer microssatélite XL2; C-par de primer microssatélite XL3; D-par de primer microssatélite XL4; E-parde primer microssatélite XL5; F -par de primer microssatélite XL6.

Fonte: NOCCHI, 2014.

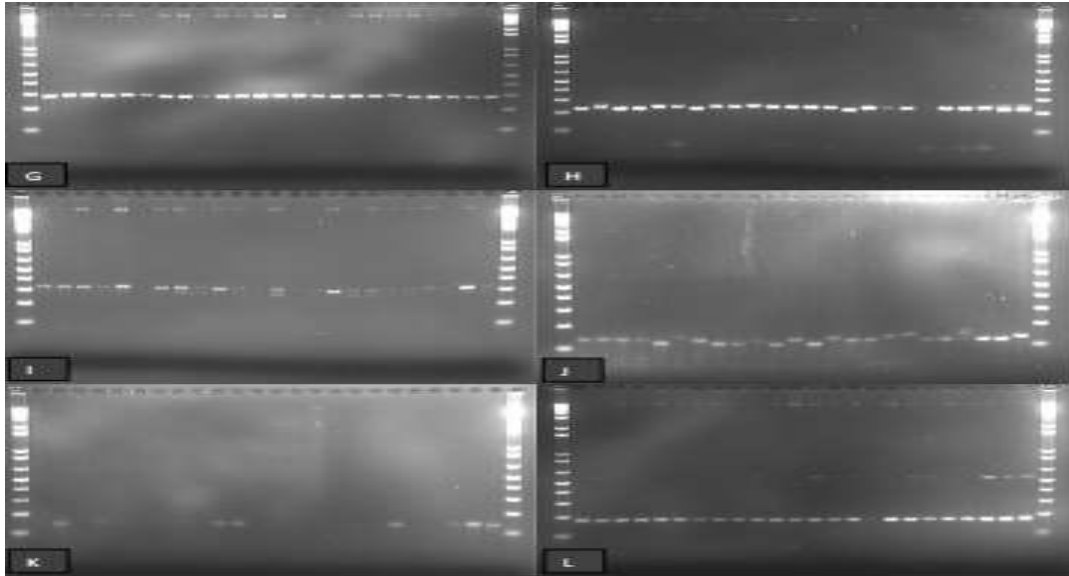


Figura 02. Produto da amplificação por PCR do DNA de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizando 14 pares de primers microssatélites revelados em gel de agarose a 2%. G -par de primer microssatélite XL7; H -par de primer microssatélite XL8; I -par de primer microssatélite XL9; J -par de primer microssatélite XL10; K -par de primer microssatélite XL11; L -par de primer microssatélite XL13.

Fonte: NOCCHI, 2014.

4 CONCLUSÃO

Desta forma, a variabilidade observada neste estudo não parece estar relacionada com o grau de suscetibilidade ao cancro cítrico do genótipo de citros que tiveram origem, porém pode estar relacionada com a existência de pressão de seleção atribuída pelos diferentes genótipos cítricos existentes no pomar ou pela possível ocorrência de contaminação dos genótipos de *Citrus* spp. com outras estirpes bacterianas provenientes de regiões próximas, visto que tanto o Paraná quanto estados vizinhos são regiões que sofrem com a presença da bactéria causadora do cancro cítrico há cerca de 50 anos.

REFERÊNCIAS

- GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O. Avaliação da resistência de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*) ao cancro cítrico e estudo da diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2014. 150f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UEM, Maringá, 2014.
- GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, v.92, p. 361-377, 2002.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A. E AGARKOVA, I. V. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, p. 690–695, 2006.